

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 門間太輔

学位論文題名

変形性関節症および骨折治癒過程における糖脂質の機能解析

(Studies on functional roles of glycosphingolipids in osteoarthritis and fracture healing process)

【背景と目的】

糖鎖は生体内で合成された未成熟なタンパク質を修飾することで機能を有する成熟したタンパク質に変化させる。この糖鎖修飾により生み出される多様性は、細胞の認識やタンパク質の品質管理に重要である。糖鎖の一群であるスフィンゴ糖脂質 (Glycosphingolipids; 以下 GSLs) はセラミドから合成される一連の糖脂質であり、脊椎動物の細胞膜上に広く存在する。脂質ラフトを構成することで細胞内シグナル伝達に関与する重要な構成要素の一つである^{1,2}。変形性関節症 (Osteoarthritis; 以下 OA) の関節軟骨において糖脂質が減少することや、糖脂質の主成分であるセラミドが軟骨の変性やアポトーシスに関与していることが報告されており OA と糖脂質の間には密接な関わりがあることが知られている^{3,4}。当科では GSLs を軟骨特異的に欠損させることで OA が助長されることを報告し⁵、さらに GSLs のうちでも、シアル酸を有するガングリオシドが OA の発症に重要な役割を担うことを明らかにしてきた⁶。しかし、OA の発症に対して糖脂質が担う役割は未だ不明な点が多い。

一方、長管骨骨折の治癒過程は内軟骨性骨化の形態をとることより、軟骨代謝に深い関わりをもつ糖脂質が、骨折治癒過程にも重要な役割を担うことが推察される。しかし、骨折治癒過程における GSLs の機能に関しても未だ不明な点が多い。そこで今回、糖脂質の整形外科疾患における機能解析のため以下の2つの仮説を立て研究を行った。

仮説①OA の病態においてガングリオシドの合成経路の下流の分子の中に OA の病態や原因に関して主要な役割を担う糖脂質が存在する

仮説②軟骨細胞における GSLs の欠損は炎症性サイトカインや成長因子のシグナル伝達が正常に機能せず、内軟骨性骨化を阻害する

本研究の目的は、OA の病態において中心的な役割を果たしている糖脂質を明らかにすることと、骨折治癒過程の内軟骨性骨化における糖脂質の役割を明らかにすることである。

【材料と方法】

本研究で糖脂質の欠損状態を模したモデルとして用いた軟骨特異的 *Ugcg* 欠損マウス (*Col2-Ugcg*^{-/-})、また、ほぼ全てのガングリオシドが欠損する *GalNAc* 転移酵素 KO マウス (*GalNAcT*^{-/-}) および一部のガングリオシドが欠損する *GD3* 合成酵素 KO マウス (*GD3S*^{-/-}) をもちいた。コントロール動物：野生型 C57BL/6 (WT) と *Ugcg*^{loxP/loxP}。加齢による OA モデル：両 genotype のマウスを 15 か月齢まで飼育。上記 *in vivo* OA モデルの膝関節は **Mankin score** で定量的に評価。**ex vivo** OA モデル：4 週齢マウス由来の大腿骨頭軟骨をインターロイキン 1 α (IL-1 α) とともに培養。培養液中に漏出するプロテオグリカンの物質量を定量。培養液中の matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) と一酸化窒素 (NO) を測定し、骨頭軟骨は HE, サフラニン O (Saf O) による形態の評価と TUNEL 染色, MMP-13 免疫染色を施行。マトリックス分解酵素遺伝子の発現量測定：MMP-13 の培養軟骨細胞中の遺伝子発現量を定量的 RT-PCR で経時的に測定。MAPK family

のリン酸化の測定：培養軟骨細胞中の MAPK family のリン酸化を WB にて経時的に測定。**Gangliosides の補充実験**：*GalNAcT^{-/-}*由来軟骨細胞で外因性にガングリオシドを補充し IL-1 α 刺激に対する MMP-13 の発現量を測定。**骨折モデルの作成**：マウス大腿骨幹部骨折を作製し骨折の治癒過程を評価した。**成長因子に対する基質産生能の評価**：培養軟骨細胞中の遺伝子発現量を定量的 RT-PCR で測定。

【結果】

in vivo OA モデル：加齢モデルにおいて WT に比べて *GalNAcT^{-/-}*、*GD3S^{-/-}*ともに有意に OA が進行し、特に *GalNAcT^{-/-}*において OA 変化は著しかった。**ex vivo OA モデル**：プロテオグリカンの漏出量も同様であった。Saf 0 染色で KO マウスの変性がより強く、TUNEL 染色、MMP-13 免疫染色でも KO マウスでの染色性が強かった。培養液中の MMP-13 濃度、NO 濃度ともに KO マウスが有意に高い数値を示した。**マトリックス分解酵素遺伝子の発現量測定**：MMP-13 は IL-1 α での刺激開始後 12 時間、24 時間において KO マウスが有意に高い発現量を示した。**MAPK family のリン酸化の測定**：MAPK family のリン酸化は IL-1 α 刺激後 15 分において KO マウスで亢進していた。**Gangliosides の補充実験**：すべてのガングリオシドを外因性に補充したときのみ IL-1 α 刺激に対する MMP-13 の発現の亢進が抑制された。**骨折モデルの作成**：*Col2-Ugcg^{-/-}*において仮骨形成が少なく、内軟骨性骨化が遷延する結果であった。**成長因子に対する基質産生能の評価**：*Col2-Ugcg^{-/-}*において Col11a1 の遺伝子発現が減弱していた。

【考察】

In vivo において、ガングリオシド生合成経路の下流のガングリオシドが欠損しても、マウスは正常に発育し、若齢では軟骨形成・分化には影響しなかったが、加齢に伴い OA がより重症化した。また、ガングリオシド生合成経路の下流のガングリオシドが欠損すると、IL-1 α 刺激への反応性が増し、MMP-13 の発現や軟骨細胞アポトーシスが増加し、軟骨中のプロテオグリカが多く失われ、軟骨変性がより増強された。以上の結果から、ガングリオシド生合成経路の下流のガングリオシドは軟骨の発生や分化には必須ではないが、正常な軟骨代謝を維持する上で重要な機能を持ち、OA の進行を抑制する機能を有する可能性が示唆された。さらに *In vitro* において、ガングリオシドを外因性に補充すると全てのガングリオシドを補充した場合にのみ IL-1 α 刺激による MMP-13 の発現上昇を有意に抑制した。この結果はガングリオシドは協調的に作用している可能性を示唆している。

一方 *in vivo* において、軟骨特異的に GSLs を欠損させた場合、骨折治癒過程の内軟骨性骨化で仮骨形成を抑制し、骨折治癒過程を遷延させた。また、*in vitro* において、軟骨特異的に GSLs を欠損させた場合、TGF β -3 に対する軟骨の肥大化がさらに抑制された。

【結論】

本研究結果は、OA の進行にガングリオシド生合成の下流のガングリオシドの機能が深く関与していることを示した。ガングリオシドは軟骨の発生や分化には必須ではないが、正常な軟骨代謝を維持する上で重要な機能を持ち、さらには協調的に作用することで OA の進行を抑制する機能を有している可能性が示唆された。これらのメカニズムに関するさらなる詳細な研究が必要であるが、OA 治療戦略の新しい有用な標的分子となりうるものと期待される。

また、骨折治癒過程において GSLs は内軟骨性骨化を促進させる可能性を示唆したことから、骨折治療の新しい分子ターゲットとなりうるものと期待される。